Н.А. Костроминиов, Е.А. Суменкова
ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко

ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМОЛЮМИНИСЦЕНЦИИ БЕРИДОНА И БЕРЕНИЛА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Хемолюминисценция - свечение, возникающее при физико-химических процессах, связанных с поглощением энергии, переходом вещества в возбужденное состояние и последующим возвращением в основное состояние с излучением кванта энергии в ультрафиолетовой, видимой, инфракрасной областях. Такое свечение продолжается от миллисекунд до нескольких часов. Люминесцентные методы исследования в настоящее время широко используются для изучения физических, химических, биохимических и биологических процессов. «Биохемилюминесценция»- это излучение света растениями, живыми организмами, органами, тканями, клетками, субклеточными структурами, биологическими жидкостями и т.д.

Самая простая химическая реакция, сопровождающаяся излучением кванта света - это разложение перекиси водорода. Оно может происходить спонтанно, например, в слабо щелочной среде, при нагревании раствора, под действием ультрафиолетового облучения или каталитически - в присутствии металлов переменной валентности, в частности, солей железа. В последнем случае процесс разложения перекиси водорода представляет собой цепную реакцию, протекающую с образованием свободных радикалов кислорода.

Свободные радикалы обладают собственным магнитным моментом, высокой химической активностью, способностью инициировать цепные реакции окисления и сравнительно малым временем жизни, что затрудняет их обнаружение.

Исследование сверхслабого свечения биологического материала: клеток, внутриклеточных структур, органов, тканей, крови т.д. в практике имеет информационное и диагностическое значение.

Хемилюминесценция в определенной степени тесно связана со свободно-радикальным окислением липидов доказательством этого служит прямапропорциональная корреляционная зависимость между интенсивностью свечения, потреблением кислорода и накоплением продуктов перекисного окисления липидов, в частности, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида.

Переход свечения из одной фазы в другую зависит от стадий окисления. Люминисцентное свечение начинается с медленной вспышки, которая совпадает с моментом, когда в среде инкубации начинают накапливаться гидроперекиси липидов. Затем появляються активные формы кислорода, это обычно происходит через 1-2 минуты после воздействия чужеродного материала на мембраны фагоцитов. Свечение достигает своего максимума за 5-6 минут и длится в течении 20-30 минут. Этот процесс сопровождается свечением, интенсивность которого резко увеличивается в присутствии люминола.

Выравнивание скорости образования и распада гидроперекисей становится причиной перехода медленной вспышки в стационарное свечение. Она характеризуется латентным периодом, крутизной нарастания и временем достижения максимума свечения, величиной максимальной интенсивности и светосуммой хемилюминесценции, которую измеряют в течении условленного времени. Перечисленные показатели зависят от количества фагоцитирующих клеток, их активности, характера чужеродного материала, механизма его взаимодействия с фагоцитом, наличия в среде инкубации опсонизирующего фактора, состава среды, ее температуры и т.д. Установлено, что величина пика хемилюминесценции зависит от фагоцитарной активности клеток. Опсонизирующая способность крови определяется временем достижения максимума хемилюминесценции и ее амплитудой. Светосумма свечения за время измерения является интегральным показателен генерации активных форм кислорода, а крутизна нарастания свечения отражает скорость активации кислородзависимого метаболизма фагоцитов. Интенсивность хемилюминесценции коррелирует с потреблением клетками кислорода и степенью завершенности фагоцитоза.

Спонтанная хемолюминисценция крови может быть использована для обнаружения иммунных комплексов, выявления повышенной чувствительности организма к различным аллергенам. При этом испытуемый материал добавляется в кровь, взятую от животного, и по изменению харак-

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции в модельной системе генерирующей активные формы кислорода (АФК)

Исследуемы препарат	Светосумма у.е.	Спонтанная светимость у.е.	Светоспышка у.е.	Максимальная светимость у.е.	Тангенс угла наклона кривой у.е.
Контроль	1,19	0,34	1,21	0,98	0,09
Беридон	0,24	0,42	0,26	1,12	0,04
Беренил	1,17	0,96	1,2	1,24	0,74

тера хемилюминесценции выявляется реакция антиген-антитело.

Известно, что многие патологические процессы сопровождаются нарушением механизмов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты, что значительно ухудшает течение и прогноз заболевания. Исследование ХЛ находит применение для оценки влияния на свободно - радикальное окисление (СРО) лекарственных средств. Антиоксиданты начинают широко использоваться при лечении и профилактике многих заболеваний, различных видов стресса.

Задача. Изучить антиокислительной активности (АОА) беридона (состоящего из беренила и антиоксиданта) в сравнении с беренилом в модельной системе прекисного окисления липидов (ПОЛ).

Материалы и методы исслодования

Антиокислительную активность препаратова оценивали по угнетению хемилюминесценции (ХЛ) модельных систем, в которых вызывали генерацию активных форм кислорода и процессов перекисного окисления липидов. Регистрацию сверхслабого свечения проводили на приборе ХЛМ - 003. Проверку стабильности работы установки проводили перед каждым измерением по эталону ЖС-19 (ГОСТ 9411-81), интенсивность свечения которого составляет $5,1x10^5$ квантов в секунду. Эта величина была принята за относительную единицу. Основными и наиболее информативными характеристиками хемилюминесценции служили светосумма свечения, определявшаяся по интенсивности излучения, и амплитуда максимального свечения. ХЛ модельных систем характеризовалась спонтанным свечением, быстрой вспышкой, возникающей при введении солей железа, и развивающейся затем медленной вспышкой. Интегральным и наиболее информативным показателем является величина светосуммы свечения. Ее изменения в модельных системах при добавлении беридона и беренила в исследованиях in vitro в процентах от контроля приведены в таблице 1. Запись хемилюминесценции в модельной системе генерирующей активные формы кислорода (АФК) в концентрации 0,1 мг/ мл.

Результаты исследований

Как видно из таблицы 1 добавление препаратов беридона и беренила в модельную систему, в которой вызывается образование активных форм кислорода, критерием оценки является уменьшение I max и светосуммы ХЛ (S). Установлено, что чем длиннее латентный период, тем в большей степени проявляется антиоксидантный эффект в сравнении с контролем и тем самым объясняется наличие высокого анти-оксидантного эффекта беридона в сравнении беренилом. Препараты сравнивались автономно с контролем и этанолом (выбор растворителей основывался исходя из физико-химических свойств исследуемых препаратов, нами было использовано ДМСО). Наибольший антиоксидангаый эффект в системе проявил беридон, снижая свечение в 5 раз по сравнению с беренилом.

Из приведенных в таблице результатов исследований мы видим, что светосумма в контроле составляет 1,19 у. е., а после добавление в модельную систему Беридона она равна 0,24, что в 5 раз ниже. После добавления беренила показатель светосуммы равен 1,17у.е., что примерно равно показателю в контроле и выше показателя светосуммы Беридона 4,87 раза.

Таким образом, нами впервые была использована в исследованиях модельная система по изучению антиоксидантной активности Беридона и беренила. Результаты показали, что беридон обладает антиоксидантной способностью, которая в 5 раз превосходит свойства беренила, Следовательно, Беридон способен взаимодействовать с различными типами радикалов и тушить хемилюминесценцию модельных систем, связанных с перекисным окислением липидов и генерацией активных форм кислорода.

Выводы

1. Показана преимущественная способность Беридона в сравнении с беренилом, взаимодействовать с различными типами